

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-190276

(43)Date of publication of application : 08.07.2003

(51)Int.Cl. A61M 1/02
A61M 1/16
A61M 1/36

(21)Application number : 2002-301672 (71)Applicant : ASAHI MEDICAL CO LTD

(22)Date of filing : 16.10.2002 (72)Inventor : ONODERA HIROKAZU
YOSHIDA HAJIME

(30)Priority

Priority number : 2001318512 Priority date : 16.10.2001 Priority country : JP

(54) VIRUS AND WHITE BLOOD CELL SELECTIVE REMOVAL METHOD, REMOVAL MATERIAL AND REMOVER**(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method capable of removing virus and white blood cell at the same time from blood containing virus and achieving high recovery of platelet, and a material and a device for the method.

SOLUTION: A water insoluble carrier having the surface for capturing virus and white blood cell in blood and passing platelet is brought into contact with blood containing virus to remove the virus and the white blood cell at the same time from the blood, and the platelet is recovered at high recovery rate. It is desirable that water insoluble carrier has an end hydrophilic group on the surface.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-190276
(P2003-190276A)

(43) 公開日 平成15年7月8日 (2003.7.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 6 1 M 1/02	5 5 0	A 6 1 M 1/02	5 5 0 4 C 0 7 7
	5 4 0		5 4 0
1/16	5 0 0	1/16	5 0 0
1/36	5 4 0	1/36	5 4 0

審査請求 未請求 請求項の数25 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2002-301672 (P2002-301672)
(22) 出願日 平成14年10月16日 (2002. 10. 16)
(31) 優先権主張番号 特願2001-318512 (P2001-318512)
(32) 優先日 平成13年10月16日 (2001. 10. 16)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000116806
旭メディカル株式会社
東京都千代田区神田美土代町9番地1
(72) 発明者 小野寺 博和
大分県大分市大字里2111番地2 旭メディカル株式会社内
(72) 発明者 吉田 一
大分県大分市大字里2111番地2 旭メディカル株式会社内
(74) 代理人 100090941
弁理士 藤野 清也 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス及び白血球選択除去方法、除去材および除去装置

(57) 【要約】

【課題】 ウイルス含有血液よりウイルス及び白血球を同時に除去し、かつ血小板の高回収率を達成することができる方法、そのための材料及び装置を提供すること。

【解決手段】 血液中のウイルス及び白血球を捕捉し血小板を通過させる表面を有する水不溶性の担体をウイルス含有血液と接触させることによって、血液からウイルスと白血球を同時に除去し、かつ血小板は高回収率で回収した。水不溶性の担体は、末端親水基を表面に有することが望ましい。

【従来の技術】従来の血液処理システムは、血漿分離膜や遠心分離装置を用いて、血漿成分と血球成分とを分離した後、血漿成分を免疫吸着材や低密度リポ蛋白質吸着材等と直接接触させ、不要物質を吸着除去するシステムであった（例えば、特許文献1～3）。これらのシステムでは、血漿成分から赤血球、白血球、血小板などの血球成分をまとめて分離するために、ウイルスなどの不要物質と白血球とを同時に除去することは困難であった。さらに、これらのシステムでは、荷電を有する材料を使用するため、血小板の活性化をきたし、不要物質や白血球を除去するのと同時に、血小板を高回収率で回収することはできない。

【0003】また、特許文献4には、白血球除去材を用いて、免疫系疾患患者の血液中から白血球と免疫グロブリンなどの悪性物質を同時に除去し、血液を浄化する方法が記載されているが、白血球とウイルスを同時に除去することも、また同時に血小板を回収することも開示されていない。

【0004】さらに、特許文献5には、ポリアミンと抗凝固剤とを表面に有する担体で血液を処理することによって、抗凝固剤なしに血液からウイルスなどの標的物質を除去する血液処理装置及び方法が開示されているが、表面に多量のアミンを有するため十分な血小板の回収は困難であり、かつ白血球除去も十分なものではなかった。

【0005】さらにまた、ウイルス除去材料としては、特許文献6に、カチオン性化合物を表面に有する材料が開示されているが、この公報には血液からウイルスを除去することについては一切記載がない。また、特許文献7には、表面が弱酸性または弱塩基性を示す固体物質からなる、HIVおよび関連物質除去剤が開示されている。この除去材は、表面に-COOHや-SO₃H等を有し、表面のpHが2.5～6.9または7.4～10.5であることが特徴であり、表面に存在する-COOHや-SO₃H等が塩を形成している場合には、ウイルスを除去できないと記載されている。さらに、特許文献7に記載されている方法では、血液を除去材に接触せると血液のpHが変化してしまうため、成分蛋白質の変性等が生じ、血液にとって好ましい条件ではない。これらの技術に共通する問題として、除去材料と血液が接触した際の血液蛋白質の変性により、血液凝固の危険性を有することが挙げられる。

【特許文献1】特開昭61-113463号公報

【特許文献2】特公平5-50302号公報

【特許文献3】特公平5-50303号公報

【特許文献4】特公平5-50301号公報

【特許文献5】特開平11-267199号公報

【特許文献6】特開平3-123630号公報

【特許文献7】特開平2-36878号公報

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、上記の従来技術の問題点を解決することにより、特に、ウイルス含有血液よりウイルス及び白血球を同時に除去し、かつ血小板の高回収率を達成することができる方法、そのための材料及び装置を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するため鋭意研究した結果、血液中のウイルス及び白血球を除去する表面を有する水不溶性の担体をウイルス含有血液と接触させることによって、血液からウイルスと白血球を同時に除去し、かつ血小板は高回収率で回収することができることを見出し、本発明に至った。更に、本発明では接触後血液中の活性化補体C3a濃度が接触前血液濃度の5倍以上となる材料を用いた場合、白血球と共にウイルスが効率よく除去できることを見出し、本発明を成した。

【0008】すなわち、本発明は、血液中のウイルス及び白血球を吸着または除去する表面を有する水不溶性の担体からなるウイルス及び白血球選択除去材と、ウイルス含有血液とを接触させる工程を含むことを特徴とする血液中からウイルス及び白血球を同時に選択的に除去する方法に関する。

【0009】また、本発明は、血液中のウイルス及び白血球を吸着または除去する表面を有する水不溶性の担体からなることを特徴とする、血液中からウイルスおよび白血球を選択的に同時に除去するための、血小板通過型のウイルス及び白血球選択除去材にも関する。

【0010】さらに、本発明は、ウイルス及び白血球選択除去材が、血液の血液導入部および血液導出部を有する容器内に含まれており、さらにウイルスおよび白血球選択除去材の容器外への流出防止手段が備えられていることを特徴とするウイルスおよび白血球選択除去装置をも提供する。

【0011】これらの方法、除去材及び装置は、血液中にC型肝炎ウイルスが含まれるときに、特に有用である。血小板通過型のウイルス及び白血球選択除去材は、担体表面に末端親水基、あるいは末端親水基とポリエチレングリコール基、更に加えて末端疎水基を有することが最も好ましい。

【0012】

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳細に説明する。本発明において、ウイルスというとき、血液中のフリーのウイルスのみでなく、蛋白結合ウイルス、白血球内にある感染したウイルス等も含む。具体的に説明すると、本発明において除去される物質は、血液中のウイルス、蛋白結合ウイルス等であり、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、HIV等の何でも除去可能であるが、特にC型肝炎ウイルスが良く除去可能である。その理由は明確ではないが、ウイルスの表面特性とウイルスのサイズの両面より白血球と同様に効率

触できる表面をいい、ウイルスが接触できない材料内部は含まない。そして、本発明において、血液中のウイルスおよび白血球を捕捉し血小板を通過させる表面を有するとは、担体表面に末端親水基等を有してさえすればよく、末端親水基等をコーティングによって表面に付与する場合のみでなく、放射線グラフトあるいは共有結合などにより官能基を担体表面に導入する場合、あるいは担体材料自体がこれらの官能基を表面に有している場合等も含む。

【0023】ウイルス及び白血球除去材は、末端親水基を有すればその他に、担体表面に末端陽性基を有していることも可能である。末端陽性基は、特に表面に陰性荷電を有するウイルスの吸着向上の面では有用に用いられる。末端陽性基を例示すると、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジプロピルアミノ基等がポリマー主鎖あるいは側鎖の末端に結合して形成される3級アミノ基、複素環等の芳香環等が挙げられる。中でもジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基等が有用に用いられる。末端が、1級あるいは2級のアミノ基である場合、イオン性が強く血小板回収率が低下するため好ましくない。末端陽性基の存在比率は、15%未満が好ましい。15%を超えると、過剰の陽性基のために、血小板回収率が低下するので好ましくない。好ましい存在比率は13%未満、最も好ましくは11%未満である。

【0024】本発明のウイルス及び白血球選択除去材は、血液との接触前後で活性化補体C3aの濃度を5倍以上活性化する材料を用いると最も効率的に白血球とウイルスを同時に除去できることが分かった。ウイルスは活性化補体C3aとのコンプレックス形成等の影響を受けて吸着され易くなり、一方、過剰の活性化補体C3a濃度上昇によりウイルス濃度が相対的に低まることで吸着性が低下することが分かった。即ち、活性化補体C3aが接触前血液濃度の5倍未満の場合ウイルスと白血球の除去能が極端に低下するため好ましくない。一方、活性化補体C3aが接触前血液濃度の5倍以上であれば有効であるが、活性化補体C3aが接触前血液濃度の1000倍以上の場合、補体によりアナフィラキシ等の原因となり実用的ではない。更に500倍以上の濃度変化が起こると血液の成分変化が顕著であるため好ましくない。より好ましい血液との接触前後での活性化補体C3a濃度は7倍以上、最も好ましくは10倍以上である。

【0025】血液との接触前後で活性化補体C3aの濃度を5倍以上活性化する材料としては、前述の末端親水基を表面に5モル%以上有する材料が用いられる。末端親水基含有モノマーを例示すると、末端親水基モノマーとして、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、2-ヒドロキシプロピルメタクリレート、2-ヒドロキシイソプロピルメタクリレート、2-ヒドロキシブチルメタクリレート、2-ヒドロキシイソブチルメタクリレート等のヒドロキシアルキルメタクリレート、メトキシジエチ

レングルコールメタクリレート、メトキシトリエチレングルコールメタクリレート、メトキシテトラエチレングルコールメタクリレート等のメトキシポリエチレングリコールメタクリレート等が挙げられる。

【0026】活性化には、これらモノマーを2元あるいは3元で共重合したポリマーが有効に用いられる。例えば、2-ヒドロキシイソブチルメタアクリレート（以下HBMAと略す）、メトキシジエチレングリコールメタアクリレート（以下MDGと略す）及びメチルメタクリレート（以下MMAと略す）のランダム共重合体（共重合モル比、HBMA/MDG/MMA=5~40:5~30:40~60）、2-ヒドロキシイソプロピルメタクリレート（以下HPMAと略す）、メトキシジエチレングリコールメタアクリレート及びメチルメタクリレートのランダム共重合体（共重合モル比 HPMA/MDG/MMA=5~40:5~30:40~70）、HPMAとジメチルアミノエチルメタクリレート（以下DMと略す）のランダム共重合体（共重合モル比 HPMA/DM=80~93:3~20）等挙げられる。特に、2-ヒドロキシイソブチルメタアクリレート（以下HBMAと略す）、メトキシジエチレングリコールメタアクリレート（以下MDGと略す）及びメチルメタクリレート（以下MMAと略す）のランダム共重合体（共重合モル比、HBMA/MDG/MMA=5~40:5~30:40~60）が最も有用に用いられる。

【0027】また、材質そのものが活性化補体C3aを接触前血液濃度の5倍以上に上昇させる場合も有効に用いられる。親水性基を表面に有する材料が用いられ、材料を例示すると、セルロース及び/またはその誘導体等の天然高分子、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート等のポリエステル、エチレンビニルアルコール共重合体、ポリウレタン等の高分子材料が有用に用いられる。活性化の面より特に好ましくは、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート等のポリエステル、エチレンビニルアルコール共重合体、セルロース等が挙げられ、最も好ましくは、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート等のポリエステルが有用に用いられる。

【0028】本発明に用いるウイルス及び白血球選択除去材の担体として、粒状、ビーズ状、多孔質体、平膜、不織布、織布等が例示できる。中でもウイルスと同時に白血球を除去でき、高い表面積を有することが出来る点より多孔質体、不織布が好ましく用いられ、最も好ましくは不織布があげられる。

【0029】また、担体の材質は、表面処理が可能なものであれば、特に限定されず、セルロース及び/またはその誘導体等の天然高分子、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート等のポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリオレフィン、ポリフッ化ビニリデン、ポリアミド、ポリイミド、ポリウレ

ウイルスおよび白血球選択除去装置である。

【0042】除去材の容器外への流出を防止する手段としては、血液成分はすべて通過させるが除去材は通過させないいずれの手段も使用可能である。少なくとも容器の出口側に除去材の材料直径より細かい目のメッシュあるいはフィルター等を設けることで実施可能である。また、担体として不織布等の繊維を用いるときは、上記のようなメッシュを用いる以外に、不織布を、容器の上端あるいは下端に接着剤を用いて接着したり、容器間の隙間に挟み込む等の手段が可能である。特に円筒状のデブスフィルターの場合は、円筒の片側末端を閉塞させ、出口側末端をノズル等に接着することで実施できる。用いられる接着剤は、血液等の液体に接触しても膨潤等の影響で接着力が弱まらないものが好ましく、例えばウレタン、エポキシ系の接着剤が有用であるが、これに限定されるわけではない。

【0043】本発明の装置は、血液の採血手段、抗凝固剤の混合手段、返血手段等とチューブで連通されて特に有用に用いられる。本発明の装置のハウジングは、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリメタクリル酸等の合成樹脂、ガラスあるいはステンレス等の金属からなるのが好ましい。

【0044】以下に、本発明の実験例及び実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。実験例として、本発明で担体を表面修飾するために用いるポリマーの製造実験例を示す。

【実験例1】2-ヒドロキシイソブチルメタアクリレート（以下HBMAと略す）、メトキシジエチレングリコールメタアクリレート（以下MDGと略す）及びメチルメタクリレート（以下MMAと略す）のランダム共重合体を通常のラジカル開始剤を用いて合成した。重合条件としては、エタノール300mlに対し、MDGモノマー、HEMAモノマー及び、MMAモノマーを（モル比/MDG:HBMA:MMA=30:20:50）、開始剤としてアゾビスバレントロニル（V-65）0.1g存在下、70℃で6時間重合を行った。得られた重合溶液は、水10L中に攪拌しながら滴下し、共重合体を析出させて水不溶分を回収した。得られた共重合体中の組成比は、モノマー仕込み比と同じであった。よって、この共重合体の末端親水基の存在比率は50%、末端疎水基の存在比率は50%になる。

【0045】

【実験例2】実験例1と同様の操作により、2-ヒドロキシイソブチルメタクリレート（HPMA）とジメチルアミノエチルメタクリレート（DM）の共重合体を作成した。共重合体のモル比HPMA:DMは、97:3であり、末端親水基の存在比率97%、末端陽性基の比率3%であった。

【0046】

【実験例3】実験例1と同様の操作により、2-ヒドロ

キシエチルメタクリレート（HEMA）とジメチルアミノエチルメタクリレート（DM）、メチルメタクリレート（MMA）の共重合体を作成した。共重合体のモル比HEMA:MMA:DMは、62:30:8であり、存在比率は、末端親水基62%、末端疎水基30%、末端陽性基8%ということになる。

【0047】

【実施例】以下にC型肝炎を対象とした血液処理システムの実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

【実施例1】実験例1にて得られた共重合体1gを70%エタノール水溶液99gに溶解し、1%コーティング液を得た。平均繊維直径2.9μmのポリエチレンテレフタレート繊維よりなる不織布（目付90g/m²、厚み0.40mm、嵩密度0.24g/cm³、比表面積0.966m²/g）1gを1%コーティング液10mlに浸した後、25℃で12時間乾燥した。得られた不織布0.01gを短冊状に裁断し、バイアル中に採取し、C型肝炎ウイルスを含む患者血液1mlを加え、37℃で2時間振盪した。その後、処理後の血液100μlバイアルにサンプリングし、5000rpmで1分間遠心分離を行い、上清中のC型肝炎ウイルス量をHCV RNAとして測定した。C型肝炎ウイルス量の測定には、日本ロッシュ社製、アンプリコアーHCVモニターを用いた。また、処理後の血液を自動血球計算装置（シスメックス社製、SF-3000型）を用いて白血球数、血小板数を求めた。また、処理前後の活性化補体C3aの濃度をネフェロメトリー法により測定し、処理前値に対する処理後値の増加率を求めた。対照実験として、本発明の除去材を入れずに実施例1と同じ操作を行った。

【0048】C型肝炎ウイルスの吸着率（%）、白血球除去率（%）、及び血小板回収率（%）は、以下の式により算出した。

$$\text{ウイルス吸着率 (\%)} = [(V_d - V_c) / V_d] \times 100$$

Vc: 対照実験血液中のウイルス濃度

Vd: 吸着実験血液中のウイルス濃度

$$\text{白血球除去率 (\%)} = [(W_d - W_c) / W_d] \times 100$$

Wc: 対照実験血液中の白血球濃度

Wd: 吸着実験血液中の白血球濃度

$$\text{血小板回収率 (\%)} = P_d / P_c \times 100$$

Pc: 対照実験血液中の血小板濃度

Pd: 吸着実験血液中の血小板濃度

結果を表1に示す。表1には、除去材を入れない対照実験例の結果も一緒に示した。対照実験例でも、白血球や血小板が容器に付着するなどにより若干の減少がみられる。

【0049】

【実施例2】平均繊維直径2.5μmのポリプロピレン

ルターとし、幅150mmで巻いた。外側にポリエチレン製のメッシュを150mm巻いた。この円筒直径は39mmであった。この円筒の両端をウレタンで閉塞し、天井部と底部にそれぞれ血液の入口と出口を有する内径41mmの円筒状ポリカーボネート容器に、円筒の外周面が容器の血液入口に、内周面が血液の出口にそれぞれ通じるように納め、白血球除去装置を作成した。抗凝固剤としてヘパリンを添加した牛新鮮血液（白血球数：4,500～6,400/ μ L、血小板数：150,000～320,000/ μ L）（ヘパリン濃度：100*10

ウイルス吸着率 白血球除去率 血小板通過率

実施例7 69% 93% 62%

【0064】

【発明の効果】上記実施例から明らかなとおり、本発明によれば、血液中に存在するウイルス及び白血球を選択的に吸着及び／又は除去することができるウイルス及び白血球除去材を提供することができる。また、上記除去

*0IU/L) 2000mLにC型肝炎ウイルス含有血漿50mLを添加した後（ウイルス量：250,000個／1）、血液ポンプにて50mL／分の一定流速で室温にて流し、白血球を除去した。白血球除去装置通過2000mL処理前後の血液中のウイルス濃度、白血球濃度及び血小板の濃度を測定し、ウイルス吸着率、白血球除去率及び血小板回収率を実施例1と同様にして求めた。結果を表6に示す。

【表6】

材を充填してなる血液処理装置を用いることによって、血液、血漿、血清等の被処理液中のC型肝炎ウイルス及び白血球を選択的に除去し、血小板を高率に回収することが可能である。

フロントページの続き

Fターム(参考) 4C077 AA07 AA12 BB02 BB03 KK09
KK11 LL01 LL02 LL15 LL16
LL17 LL23 MM04 MM06 MM09
NN02 NN15 PP02 PP09 PP10
PP12 PP13 PP15 PP21